

PGM 检测方法

S10080

1 原理

α -D-Glucose 1-phosphate $\xrightarrow{\text{PGM}}$ α -D-Glucose 6-phosphate

α -D-Glucose 6-phosphate + β -NAD \longrightarrow 6 phosphate-D-gluconate + β -NADH

NADH 的消耗可以通过 340nm 的光吸收进行检测。

2 试剂:

A 250mM 甘氨酸甘氨酸(Gly-Gly) ,pH 7.4

B 150mM 磷酸葡萄糖二钾盐(G1-P)溶液

C 20mM NAD 溶液

D 900mM MgCl 溶液

E 260mM L 半胱氨酸盐酸盐(Cys)溶液, pH 7.0

F 100U/ml G-6-P

酶稀释液:同试剂 A

3 操作规程:

3.1 仪器参数设定

若仪器中无已保存参数,按以下参数设定。若已有相关参数,调取后确认。

检测方法:动力学扫描

测量波长: 340nm 测量时间: 300s

延迟时间: 240s 积分时间: 60s

系数/因子: 23.473 测量温度: 30+1℃

3.2 样品准备

若待测样品为固体,可以按 10mg 样品/1000ul 超纯水比例溶解。溶解后于 2-8 度放置 30min.

3.3 检测方法

3.3.1 在石英比色皿中加入 408ul 试剂 A, 20ul 试剂 B, 20ul 试剂 C, 10ul 超纯水, 20ul D, 100ul 试剂 E, 2ul 试剂 F 于 30 度孵育 2min,

3.3.2 加入 4ul 样品后(样品需稀释到 2U/ml 检测),温和混匀后开始测定.

3.3.3 测定结束后,记录相应数值:起始读数、 $\Delta A/\text{min test}$. 活性值(U/ml)。

3.3.4 活性值(U/ml)需稀释至 2U/ml,若超出范围,待测样品需经试剂 D 稀释后再次进行检测。

3.3.5 测定样品前需检测空白反应值,即其他操作不变,用 4ul A 代替样品加入比色皿后

进行反应,测定 $\Delta A/\text{min blank}$.

3.3.6 计算公式活 性(U/ml) = $(\Delta A/\text{min test} - \Delta A/\text{min blank}) \times 23.473 \times \text{df}$ (稀释倍数)